PROTEUS Protein A　Midi Kit 簡易取扱説明書

キット内容(PC-AK04)

・プレパックレジンプラグ(プロテイン A 結合アガロースビーズカラム)　4 個
・プレパックレジン用バレル(アングルローター使用で容量 20mL)　4 個
・50mL 遠心チューブ　8 個
・1x Binding Buffer(Buffer A)　250mL×1 本
・1x Elution Buffer(Buffer B1)　125mL×1 本
・1x Elution Buffer(Buffer B2)　125mL×1 本
・Neutralization Buffer(Buffer C)　30mL×1 本
・10kDa MWCO 限外濾過カラム　4 個
・プラグ挿入用器具　1 本
・取り扱い説明ハンドブック

保存

プレパックレジンプラグは、2〜8℃で保存して下さい。他は室温保存で問題ありません。(バッファー各種は、0.1%アジ化ナトリウムを含んでおります。)
プレパックレジンプラグを凍結させたり、室温保存しないようにご注意下さい。

他の使用器具

・フィルターユニット：0.2μm と 1.2μm のシリンジフィルター(サンプルの前処理に使用します。)
　　例) Millipore 社 0.2μm Steriflip GP unit(カタログ番号 SCGP 005 25)

使用方法

1.レジンプラグの挿入
　プレパックレジンプラグを、挿入用器具でバレルに押し込みます。英文の簡易取扱説明書に記載された図をご参照下さい。

2.スピンカラムの平衡化(合計遠心時間=3 分間)
　10mL の Binding Buffer A を、1 の操作で組み立てたスピンカラムに入れ、500×g で 3 分間遠心します。

株式会社エムエステクノシステムズ
東日本 TEL 03-3235-0673 西日本 TEL 06-6396-6616
e-mail : technosales@technosaurus.co.jp

3.**サンプルの前処理**

12-15mL **のサンプルを、**0.2μm **シリンジフィルターに通し、細胞の残渣などを除去します。**

＊腹水、血清、細胞培養上清では、保存や凍結･融解の繰り返しによるタンパク質の沈殿が起こります。あらゆるクロマトグラフィーにおいて、サンプルをカラムにローディングする直前に 0.2μm **シリンジフィルターに通す操作が重要です。**

4.**サンプルローディング(合計遠心時間**=30 **分間)**

サンプルを Binding Buffer A **で** 1:1 **の割合で希釈します。**(v/v; **例として、**10mL **のフィルター処理済みサンプルと** 10mL **の** Binding Buffer A **を混合する)**

チューブの蓋を閉めて 3～4 **回転倒混和します。希釈したサンプルを** 20mL **取り、スピンカラムにローディングします。スピンカラムを** 100×g **で** 30 **分間遠心します。**

＊スピンカラム内にサンプルが残っている場合は、遠心時間または遠心力を増やして下さい。

5.**カラムの洗浄(合計遠心時間**=6 **分間)**

スピンカラムに 10mL **の** Binding Buffer A **を入れ、**500×g **で** 3 **分間遠心し、プラグに結合しなかった不要物を洗い流して除去します。この操作をもう** 1 **回行います。**

～ここから先の溶出操作は、抗体の種類によって次のように進めて下さい。～

･**マウス**IgG1、**ラット**IgG1、**ラット**IgG2a、**ラット**IgG2b、**ウシ**IgG1…**手順** 6→7

･**上記以外の** IgG、**マウス** IgG2a、**マウス** IgG2b、**マウス** IgG3、**ラット** IgG2c、**ヒト** IgG1-IgG4、**ウサギ**IgG、**モルモット**IgG1、**モルモット**IgG2、**ウシ**IgG2 **など、他の**IgG…**手順** 7

6.**新しい遠心チューブに** 0.5mL **の** Neutralization Buffer C **を入れておき、そこにスピンカラムを移します。スピンカラムに** 10mL **の** Elution Buffer B1 **を入れ、**500×g **で** 3 **分間遠心して** IgG **を溶出します。チューブを穏やかに振って溶出液と** Neutralization Buffer C **を完全に混合します。この操作をもう一度繰り返します。**

＊精製抗体を濃縮して回収したい場合、2 **つの溶出画分を別々にプールしないで下さい。**

7.**新しい遠心チューブに** 1.3mL **の** Neutralization Buffer C **を入れておき、そこにスピンカラムを重ねます。スピンカラムに** 10mL **の** Elution Buffer B2 **を入れ、**500 g **で** 3 **分間遠心して** IgG **を溶出します。チューブを穏やかに振って溶出液と** Neutralization Buffer C **を完全に混合します。この溶出操作をもう一度繰り返します。**

＊精製抗体を濃縮して回収したい場合、2 **つの溶出画分を別々にプールしないで下さい。**

株式会社エムエステクノシステムズ
東日本 TEL 03-3235-0673 西日本 TEL 06-6396-6616
e-mail : technosales@technosaurus.co.jp

8.精製抗体の脱塩と濃縮

必要に応じて、10kDa MWCO 限外濾過カラムで抗体の脱塩と濃縮を行います。抗体を 2～8℃で保存する場合は、0.05～0.2%(w/v)のアジ化ナトリウムを加えて下さい。長期保存には、10～50%のグリセロールを加え、少量ずつに分注して－20℃で凍結保存することをお薦めします。

9.プロテイン A ミディプラグの再生

スピンカラムに 10mL の Elution Buffer B2 を加え、500×g で 3 分間遠心してミディプラグを洗浄します。
続いて、スピンカラムに 10mL の Binding Buffer A を加え、同様の遠心操作を行います。
すぐに次の精製を行う場合は、再び手順 1 から操作を進めて下さい。
また、再生したプラグは保存することもできます。エンドキャップを外したままで、Binding Buffer A か、0.1%アジ化ナトリウム溶液(超純水で調製)に浸し、次の使用まで 2～8℃で保存して下さい。

株式会社エムエステクノシステムズ
東日本 TEL 03-3235-0673 西日本 TEL 06-6396-6616
e-mail : technosales@technosaurus.co.jp